

METHOD OF OBTAINING POLYPEPTIDES IN CELL-FREE TRANSLATION SYSTEM.**Publication number:** EP0312617**Publication date:** 1989-04-26**Inventor:** ALAKHOV JULY BORISOVICH; BARANOV VLADIMIR
IVANOVICH; OVODOV SERGEI JURIEVICH;
RYABOVA LJUBOV ANATOLIEVNA; SPIRIN
ALEXANDR SERGEEVICH**Applicant:** INST BELKA AKAD NAUK SSSR (SU)**Classification:****- International:** C12N15/09; C12P21/00; C12P21/02; C12N15/09;
C12P21/00; C12P21/02; (IPC1-7): C12N15/00;
C12P21/00**- European:** C12P21/02**Application number:** EP19880904712 19880414**Priority number(s):** SU19874239148 19870429**Also published as:**WO8808453 (A1)
SU1441787 (A1)
FI886002 (A)
EP0312617 (A4)
EP0312617 (B1)**Report a data error here****Abstract of EP0312617**

Polypeptides are obtained in a cell-free translation system on ribosomes which contains, as substrates, ATP, GTP and amino acids with the resulting translation products containing the desired product, AMP, GDP, pyrophosphate and inorganic phosphate. In the course of the translation process, as the substrates are consumed and the products are obtained, the products of translation including AMP, GDP, pyrophosphate, inorganic phosphate and the desired product are extracted from the system, while simultaneously introducing in the system substrates in the form of amino acids, ATP and GTP for the purpose of maintaining their initial concentration.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

veröffentlicht nach Art. 158 Abs. 3 EPÜ

⑰ Anmeldenummer: **88904712.2**

⑤① Int. Cl.⁴: **C 12 P 21/00, C 12 N 15/00**

⑱ Anmeldetag: **14.04.88**

Daten der zugrundeliegenden internationalen Anmeldung:

⑥⑤ Internationale Anmeldenummer:
PCT/SU 88/00078

⑥⑦ Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 88/08453 (03.11.88 88/24)

③① Priorität: **29.04.87 SU 4239148**

⑦① Anmelder: **INSTITUT BELKA AKADEMII NAUK SSSR, Moskovskaya obl., Puschino 142292 (SU)**

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung: **26.04.89**
Patentblatt 89/17

⑦② Erfinder: **ALAKHOV, Joly Borisovich, mikroralon V, 32-38 Moskovskaya obl., Puschino, 142292 (SU)**
Erfinder: **BARANOV, Vladimir Ivanovich, mikroralon D, 1-40 Moskovskaya obl., Puschino, 142292 (SU)**
Erfinder: **OVODOV, Sergei Jurlevich, mikroralon G, 5-39 Moskovskaya obl., Puschino, 142292 (SU)**
Erfinder: **RYABOVA, Ljubov Anatolievna, mikroralon G, 22-81 Moskovskaya obl., Puschino, 142292 (SU)**
Erfinder: **SPIRIN, Alexandr Sergeevich, ul. Profsojuznaja, 43-1-10, Moscow, 117420 (SU)**

⑥④ Benannte Vertragsstaaten: **AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE**

⑦④ Vertreter: **von Föner, Alexander, Dr. et al, Patentanwälte v. Föner, Ebbinghaus, Finck Marienhilfplatz 2 & 3, D-8000 München 90 (DE)**

⑤④ **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON POLYPEPTIDEN IN ZELLFREIEN TRANSLATIONSSYSTEMEN.**

⑤⑦ Polypeptide erhält man in einem zellfreien Translation-System an Ribosomen, das als Substrate ATP, GTP und Aminosäuren enthält, unter Entstehung der Produkte der Translation im System, die das Endprodukt, AMP, GDP, Pyrophosphat und anorganisches Phosphat beinhalten. Während der Translation werden aus dem System im Maße des Verbrauchs der Substrate mit Bildung der Produkte die Produkte der Translation, die AMP, GDP, Pyrophosphat, anorganisches Phosphat und Endprodukt beinhalten, mit der gleichzeitigen Einführung von Substraten in Form von Aminosäuren, ATP und GTP zur Unterhaltung ihrer Ausgangskonzentration herausgeführt.

EP 0 312 617 A1

VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON POLYPEPTIDEN
IN EINEM ZELLFREIEN TRANSLATION-SYSTEM

Gebiet der Technik

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Mole-
5 kularbiologie und Biotechnologie und betrifft insbeson-
dere Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden in einem
zellfreien Translation-System.

Die genannten Polypeptide werden umfassend in der
Medizin als Bioregulatoren der biologischen Prozesse ver-
10 wendet. Beispeilsweise, sind Polypeptide-Aktivatoren des
Immunosystems, Polypeptide-Neuromediatoren und Trasmmitter,
Polypeptide-Regulatoren des Salzstoffwechsels und ande-
res mehr bekannt. Bekannt ist die Verwendung der Polypep-
tide in der Landwirtschaft als Biostimulatoren, beispiels-
15 weise Wachstumshormone. Polypeptide werden auch in der
Bioelektronik, beispielsweise als Filme mit Rhodopsin
verwendet.

Vorhergehender Stand der Technik

Bekannt sind zwei Methoden zur Herstellung von Poly-
20 peptiden: chemische Synthese und Methode der Gentechnik.

Die Methode der chemischen Synthese wird umfassend
bei der großtechnischen Produktion von Polypeptiden mit
relativ geringer Länge (höchstens 15 Aminosäurereste) und
nur in Ausnahmefällen für die Synthese einiger Polypepti-
25 de größerer Länge (25-30 Aminosäurereste) angewendet. Die
Produktion von Polypeptiden größerer Länge unter Verwen-
dung dieser Methode ist praktisch unzugänglich. Das ist
darauf zurückzuführen, daß bei der Anwendung der Methode
der chemischen Synthese mit der Vergrößerung der Polypep-
30 tidkette die Ausbeute an Endprodukt infolge der Razemi-
sierung der Aminosäurereste, der Unvollständigkeit der
Verlängerung der Polypeptidkette, der Kompliziertheit der
Wahl von Schutzgruppen und ihrer Beseitigung exponential
herabsinkt. All das verursacht große Schwierigkeiten bei
35 der Reinigung des Endproduktes und eine starke Steigerung
der Kosten der Polypeptide im Maße der Vergrößerung ihrer
Länge.

Die Methode der Gentechnik für die präparative Speicherung von Polypeptiden ist auch in der Anwendung begrenzt. Das ist mit der Kompliziertheit der Aussonderung des Expressionsproduktes mit Hilfe der transformierten
5 Zellen, mit der Letalität einiger Endprodukte für die Produzenten-Zelle, mit der Ausscheidung der transformierten Plasmide aus einer Zelle und mit der proteolytischen Degradation des Expressionsproduktes eines fremden Gens verbunden. Der letzte Umstand ruft besondere Schwierig-
10 keit bei der Aussonderung vieler Polypeptide, insbesondere Polypeptide mit einer Länge von 15 bis 70 Aminosäureresten hervor, die sich infolge des Fehlens kompakter Struktur in ihnen durch die intra- und extrazellulären Proteasen abbauen lassen.

15 Aus dem Obendargelegten geht hervor, daß die beschriebenen Methoden der Produktion von Polypeptiden für die Erzeugung der Polypeptide mit einer Länge von 15 bis 70 Aminosäureresten praktisch nicht anwendbar sind. Zugleich ist es bekannt, daß gerade solche Länge viele bio-
20 logisch aktive Polypeptide, solche wie Peptide-Aktivatoren des Immunsystems, Peptide-Neuromediatoren und Transmitter sowie Peptide-Aktivatoren des Salzstoffwechsels aufweisen.

Es besteht eine weitere Methode zur Synthese von Polypeptiden, die auf der Nutzung eines zellfreien Translation-Systems beruht. Gegenwärtig ist eine ganze Reihe von
25 zellfreien Translation-Systemen auf der Grundlage von Zellenextrakten aus verschiedenen prokaryonten und eukaryonten Organismen entwickelt.

Bekannt ist, beispielsweise, ein Verfahren zur Er-
30 zeugung von Polypeptiden, das darin besteht, daß man in einem zellfreien Translation-System aus Weizenkeimen die Synthese des Globin-Polypeptids eines Kaninchens vornimmt (Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 70 1973 USA).

1 ml zellfreies Translation-System an Ribosomen ent-
35 hält 0,5 ml Extrakt aus Weizenkeimen, 0,125 nMol 9S mRNS des Kaninchensglobins, 8 mMol Kreatinphosphat, 40 g Kreatinphosphokinase, 2-10 µg Ribonuklease-Inhibitor aus der Plazenta des Menschen, je 0,1 µg Protease-Inhibitoren

(Pepstatin, Chymostatin, Antipain, Leupeptin) in einer Pufferlösung von 20 mMol HEPES (pH 7,6), die 80 mMol K^+ - Azetat, 3,0 mMol Mg^{2+} Azetat, 1 mMol ATP, 20 mMol GTP, 2 mMol Dithiotreit, 100 μ Ci/mMol [^{35}S]-Methionin
5 (spezifische Aktivität beträgt 89 Ci/mMol, 19 übrige Aminosäuren zu je 20 mMol jede enthält.

Die Synthese des Polypeptids in einem zellfreien Translation-System wird bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Bei der Synthese werden im System Transla-
10 tionsprodukte gespeichert, die das Endprodukt und die Abbauprodukte in Form von AMP, GDP, Pyrophosphat, Phosphat, Kreatin u.a. aufweisen. Infolge der Inhibierung wird die Synthese des Endproduktes in 60 bis 90 Minuten zum Stillstand gebracht. Die Analyse des Endproduktes nach einer
15 radioaktiven Markierung [^{35}S]-Methionin, die in das Polypeptid einbezogen ist, erfolgt im Verfahren der heißen Fällung von Polypeptid an einem Filter mit 5%iger Trichloressigsäure. Die Menge des synthetisierten Endproduktes beträgt in 60 bis 90 Minuten < 0,58 Picomol Globins
20 je 1 Picomol der Matrix.

Das obenbetrachtete Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden ist eines der von den bekannten besonders effektiven Verfahren, in denen zellfreie Translationssysteme verwendet werden. Sogar diese Systeme gewährleisten
25 jedoch die Synthese maximal nur von einer oder zwei Kopien des Polypeptids je eine Kopie der mRNA infolge einer kurzen Dauer der Arbeit eines derartigen zellfreien Systems, lediglich 1 bis 2 Stunden.

Die Hauptursachen der kurzen Dauer der Arbeit der
30 zellfreien Translation-Systeme bestehen in folgendem:

1. Zellfreie Translation-Systeme enthalten eine begrenzte Anzahl von ATP- und GTP-Energieträgern, die Erhöhung des Gehaltes an denen zur Inhibierung des jeweiligen Translation-Systems führt.
- 35 2. Die Abbauprodukte; die bei der Synthese des Polypeptids in einem zellfreien Translation-System ADP, AMP, GDP, Phosphate und Pyrophosphate entstehen, sind Inhibitoren der Synthese von Polypeptiden.

3. Endprodukt kann auch Inhibitor der Synthese sein.

Offenbarung der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein solches Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden in einem
5 zellfreien Translation-System zu entwickeln, welches es ermöglicht, ein Endprodukt in präparativen Mengen durch die Vergrößerung der Dauer der Arbeit des zellfreien Systems der Synthese von Polypeptiden zu gewinnen.

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß ein solches
10 Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden in einem zellfreien Translation-System an Ribosomen, das als Substrate ATP, GTP und Aminosäuren enthält, unter Entstehung von Translationsprodukten im System, die das Endprodukt, AMP, GDP, Pyrophosphat und anorganisches Phosphat auf-
15 weisen, vorgeschlagen wird, in dem erfindungsgemäß bei der Translation im Maße des Verbrauchs der Substrate mit Anfallen der Produkte aus dem System die Produkte der Translation, die AMP, GDP, Pyrophosphat, anorganisches Phosphat und Endprodukt aufweisen, mit der gleichzeitigen
20 Einführung von Substraten ins System in Form von Aminosäuren, ATP und GTP für die Unterhaltung ihrer Ausgangskonzentration herausgeführt werden.

Als ein zellfreies Translation-System können in dem erfindungsgemäßen Verfahren prokaryonte beziehungsweise
25 eukaryonte zellfreie Translation-Systeme verwendet werden, die sowohl endogene als auch exogene natürliche oder künstlich synthetisierte mRNS aufweisen. In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden jene Verhältnisse der Komponenten im Reaktionsgemisch, Ionen- und Temperaturbedingungen der
30 Synthese angewendet, die für das gewählte zellfreie Translation-System optimal sind.

Die erfindungsgemäße Methode der Synthese von Polypeptiden in einem zellfreien Translation-System ist frei von den Nachteilen der Methoden der chemischen Synthese
35 und der Gentechnik und kann für die Herstellung von Polypeptiden beliebiger Länge und Aminosäure-Konsequenz eingesetzt werden. Diese Eigenschaft ist besonders für die

Herstellung von Polypeptiden mit einer Länge von 15 bis 70 Aminosäureresten von Bedeutung, deren industriemäßige Herstellung in anderen Verfahren gegenwärtig unzugänglich ist oder einen äußerst kostspieligen Prozeß darstellt.

- 5 Das erfindungsgemäße Verfahren bewirkt die Synthese von Polypeptiden in einem zellfreien Translation-System mit einer konstanten Geschwindigkeit innerhalb von 40 Stunden und darüber hinaus. Die Menge des gewonnenen Endproduktes beträgt dabei 200 bis 300 Kopien des Polypeptids je eine mRNS-Kopie. Aus 1 Liter des Reaktionsgemisches gelingt es bei der Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens, bis zu 100 mg Fertigproduktes innerhalb von 10 50 bis 100 Stunden der Arbeit des Systems zu gewinnen. Das erschließt Möglichkeiten für die industriemäßige 15 Produktion von Polypeptiden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Nachstehend wird die Erfindung anhand der Beispiele ihrer Ausführung mit Bezugnahme auf beigegefügte Zeichnungen erläutert, in denen es zeigen:

- 20 Fig. 1, 2, 3 und 4 - Diagramm der Abhängigkeit der Menge des zu synthetisierenden Polypeptids je mRNS-Einheit von der Synthesedauer;

- Fig. 5 stellt ein Bild des SDS-Harnstoff-Polyakrylamid-Gels dar, an dem die Verteilung der gewonnenen Polypeptide entsprechend ihrem Molekulargewicht gezeigt wird. 25

Beste Ausführungsvariante der Erfindung

- Das Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden in einem zellfreien Translation-System ist einfach in technologischer Ausführung und wird wie folgt durchgeführt. 30

- Das zellfreie Translation-System aus Prokaryonten oder aus Eukaryonten, das Ribosome, Faktoren der Translation, tRNS-, mRNS-Aminoazyl, Substrate der Reaktion, einschließlich ATP, GTP und Aminosäuren aufweist, wird in 35 an sich bekannter Weise hergestellt.

Das zellfreie Translation-System unterbringt man in

eine Standard-Zelle zur Ultrafiltration, die mit einer semipermeablen Membrane mit einem Porendurchmesser versehen ist, der für die Permeabilität des Endproduktes durch die Membrane ausreichend ist. Der Inhalt der Zelle
5 wird dann in einem Thermostat auf die erforderliche Temperatur erwärmt.

Bei der Synthese wird aus der Zelle durch die semipermeable Membrane das Abpumpen der Translationsprodukte aus dem System, einschließlich Abbauprodukte und das syn-
10 thetisierte Endprodukt, vorgenommen. Gleichzeitig damit werden dem System Substrate in Form von ATP, GTP und Aminosäuren zur Unterhaltung ihrer Ausgangskonzentration aus einem Extrabehälter zugeführt.

Zur weiteren Ausscheidung und Reinigung des Endpro-
15 duktes wird die aus dem System abzupumpende Lösung einer Säule mit einem Immunaффinitätssorptionsmittel zugeführt, an dem die selektive Adsorption des Endproduktes erfolgt. Nach der Beendigung der Synthese wird das Endprodukt von der Säule mit dem Immunosorptionsmittel abgespült und
20 entsalzt.

Beispiel 1

1 ml zellfreies Translation-System enthält 0,6 nMol 70S Ribosome E.coli, 1 mg Fraktion S 100, 0,6 mg tRNS, 0,06 nMol mRNS des Proteins der Hülle der MS2-Phage, 5 µg
25 Pyruvatkinase, 2 bis 10 µg Ribonuklease-Inhibitor aus der Plazenta des Menschen, je 0,1 µg Protease-Inhibitoren (Aprotinin, Leupeptin, Chymostatin) in einer Pufferlösung: 20 mMol Tris HCl (pH 7,4), 100 mMol NH₄Cl, 10 mMol MgCl₂, 1 mMol ATP, 0,2 mMol GTP, 5 mMol Phosphoenolpyruvat,
30 25 mMol [³H]-Leuzin (spezifische Aktivität 52 Ci/mMol) und je 25 mMol übrige 19 Aminosäuren.

Das zellfreie Translation-System unterbringt man in einer Zelle für Ultrafiltration und führt man die Synthese des Polypeptids bei einer Temperatur von 37°C durch. Die
35 Wahl der Produkte der Translation, die das Endprodukt und die Abbauprodukte aufweisen, erfolgt durch eine semipermeable Membrane mit der gleichzeitigen Zuführung von Substraten in Form von ATP, GTP und Aminosäuren dem Reaktions-

gemisch innerhalb von 20 Stunden. Hierdurch erhält man Protein der Hülle der MS2-Phage.

- Während dieser ganzen Zeit erfolgt die Synthese des Endproduktes mit konstanter Geschwindigkeit. Die Abhängigkeit der Menge des herzustellenden Proteins der Hülle je mRNS-Einheit von der Dauer der Synthese ist in der Fig. 1 angeführt. An der Abszissenachse ist die Dauer der Synthese in Stunden und an der Ordinatenachse die Menge des anfallenden Produktes in Picomol abgelegt.
- Hierdurch wurden im Verlaufe der Arbeit des zellfreien Translation-Systems aus E.coli 6000 Picomol des Hüllenproteins gewonnen, was 100 Picomol des Endproduktes je 1 Picomol der mRNS der Hülle der MS2-Phage betrug.

Beispiel 2

- Man gewinnt Kalzitinin nach der in Beispiel, 1 beschriebenen Methodik mit Ausnahme dessen, daß man anstelle des mRNS-Proteins der Hülle der MS2-Phage 0,06 nMol des mRNS-Kalzitons verwendet. Hierdurch erhält man Kalzitinin-Peptid. Während der ganzen Zeit geht die Synthese des Endproduktes mit konstanter Geschwindigkeit vor sich. Die Abhängigkeit der Menge des anfallenden Kalzitons je mRNS-Einheit von der Dauer der Synthese ist in der Fig. 2 abgebildet. Hierdurch wurden während der Arbeit des zellfreien Translation-Systems aus E.coli 18000 Picomol Kalzitinin gewonnen, was 300 Picomol Fertigproduktes je 1 pMol des mRNS-Kalzitons beträgt.

Beispiel 3

- 1 ml zellfreies Translation-System enthält 0,5 ml Extrakt aus Weizenkeimen, 0,1 nMol mRNS-Virus BMV, 64 µg Kreationphosphokinase, von 2 bis 10 µg Ribonuklease-Inhibitor aus der Plazenta des Menschen, je 0,1 µg Protease-Inhibitor (Aprotinin, Pepstatin, Leupeptin) in einer Pufferlösung: 40 mMol HEPES (pH 7,6), 112 mMol K⁺ Azetat, 1,9 mMol Mg²⁺ Azetat, 0,25 mMol Spermidin, 6 mMol Dithio-
- treit, 1,5% Glyzerin, 2 mMol ATP, 50 mMol GTP, 8 mMol Kreationphosphat, 25 Mol [³H]-Leuzin (spezifische Aktivität 50 Ci/mMol) und je 25 mMol übrige 19 Aminosäuren.

Das zellfreie Translation-System unterbringt man in

eine Zelle für die Ultrafiltration und man führt die Synthese der Polypeptide bei einer Temperatur von 25°C durch. Die Wahl der Translationprodukte, die das Endprodukt und die Abbauprodukte enthalten, erfolgt durch eine semipermeable Membrane mit der gleichzeitigen Zuführung von Substraten in Form von ATP, GTP und Aminosäuren innerhalb von 20 Stunden. Im Ergebnis erhält man Protein der Hülle des BMV-Virus. Während der ganzen Zeit erfolgt die Synthese des Endproduktes mit einer konstanten Geschwindigkeit. Die Abhängigkeit der Menge des anfallenden Proteins der Hülle des BMV-Virus je mRNS-Einheit von der Dauer der Synthese ist in der Fig. 3 abgebildet. Hierdurch wurden während der Arbeit des zellfreien Translation-Systems aus Weizenkeimen 10000 Picomol Protein der Hülle des BMV-Virus gewonnen, was 100 Picomol Fertigprodukt je 1 Picomol mRNS des Proteins der Hülle des BMV-Virus betrug.

Beispiel 4

Man erhält das Kalzitonin nach der in Beispiel 3 beschriebenen Methodik mit Ausnahme dessen, daß man anstelle von mRNS des Proteins der Hülle des BMV-Virus 0,1 nMol mRNS-Kalzitonin verwendet. Hierdurch erhält man Kalzitonin-Peptid. Während der ganzen Zeit erfolgt die Synthese des Endproduktes mit konstanter Geschwindigkeit. Das Diagramm der Abhängigkeit der Menge des anfallenden Kalzitonins je Einheit des mRNS-Kalzitonins von der Dauer der Synthese ist in Fig. 4 abgebildet. Hierdurch wurden während der Synthese im zellfreien Translation-System aus Weizenkeimen 15000 Picomol Kalzitonin gewonnen, was 150 Picomol Fertigproduktes je 1 Picomol mRNS-Kalzitonins betrug.

Elektrophoretische Analyse der gewonnenen Polypeptide (Beispiele 1 bis 4) ist in der Fig. 5 abgebildet. Die Färbung der Polypeptide im Gel erfolgt mit Goomassie brilliant blue G-250

A - Standardsatz von Polypeptiden (Amersham)

B - kommerzielles Kalzitonin (Salmon calcitonine, Sigma)

C - Protein der Hülle des BMV-Virus (Beispiel 3)

- D - Kalzitinin: (Beispiel 4) der untere Striefen - Kalzitinin mit Molekulargewicht von 3400; der obere Streifen - Beimengung der dimeren Form des Kalzitoinins;
- 5 E - Protein der Hülle der MS2-Phage (Beispiel 1);
- F - Kalzitinin (Beispiel 2).

Aus der vorgelegten Fotografie ist zu ersehen, daß die anfallenden Polypeptide ein Molekulargewicht aufweisen, das ihren Naturanalogen entspricht.

10

Industrielle Anwendbarkeit

Die gemäß dem vorgeschlagenen Verfahren herzustellenden Polypeptide können in der Medizin, Landwirtschaft und in der Bioelektronik verwendet werden.

PATENTANSPRUCH

Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden in einem zellfreien Translation-System an Ribosomen, das als Substrate ATP, GTP und Aminosäuren aufweist, mit Entstehung

5 von Translationsprodukten im System, die Endprodukt, AMP, GDP, Pyrophosphat und anorganisches Phosphat beinhalten, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , daß während der Translation im Maße des Verbrauchs der Substrate mit Bildung der Produkte aus dem System Produkte der

10 Translation, die APM, GDP, Pyrophosphat, anorganisches Phosphat und Endprodukt beinhalten, mit der gleichzeitigen Einführung von Substraten in das System in Form von Aminosäuren, ATP und GTP zur Unterhaltung ihrer Ausgangskonzentration herausgeführt werden.

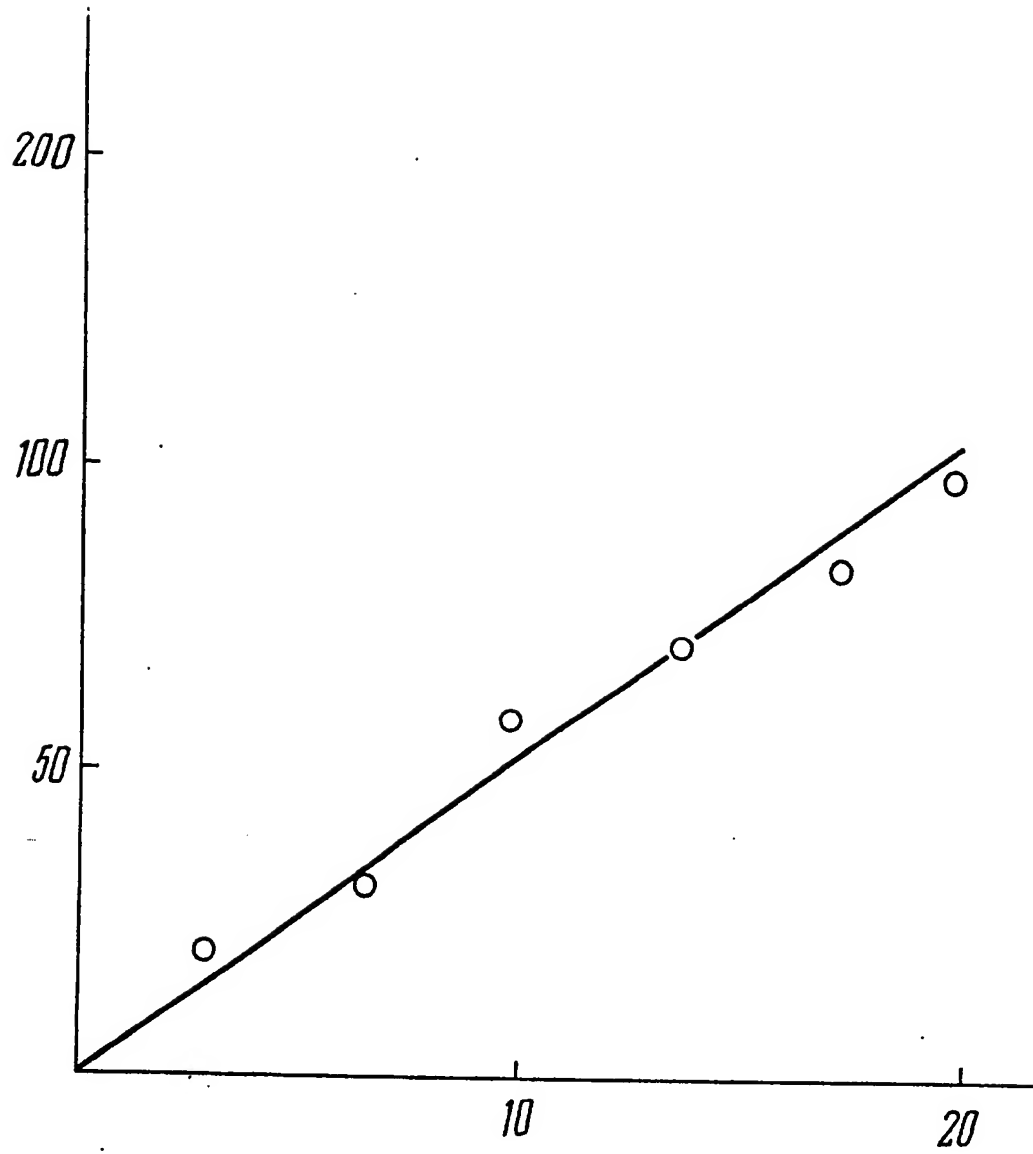
$1/5$ 

FIG. 1

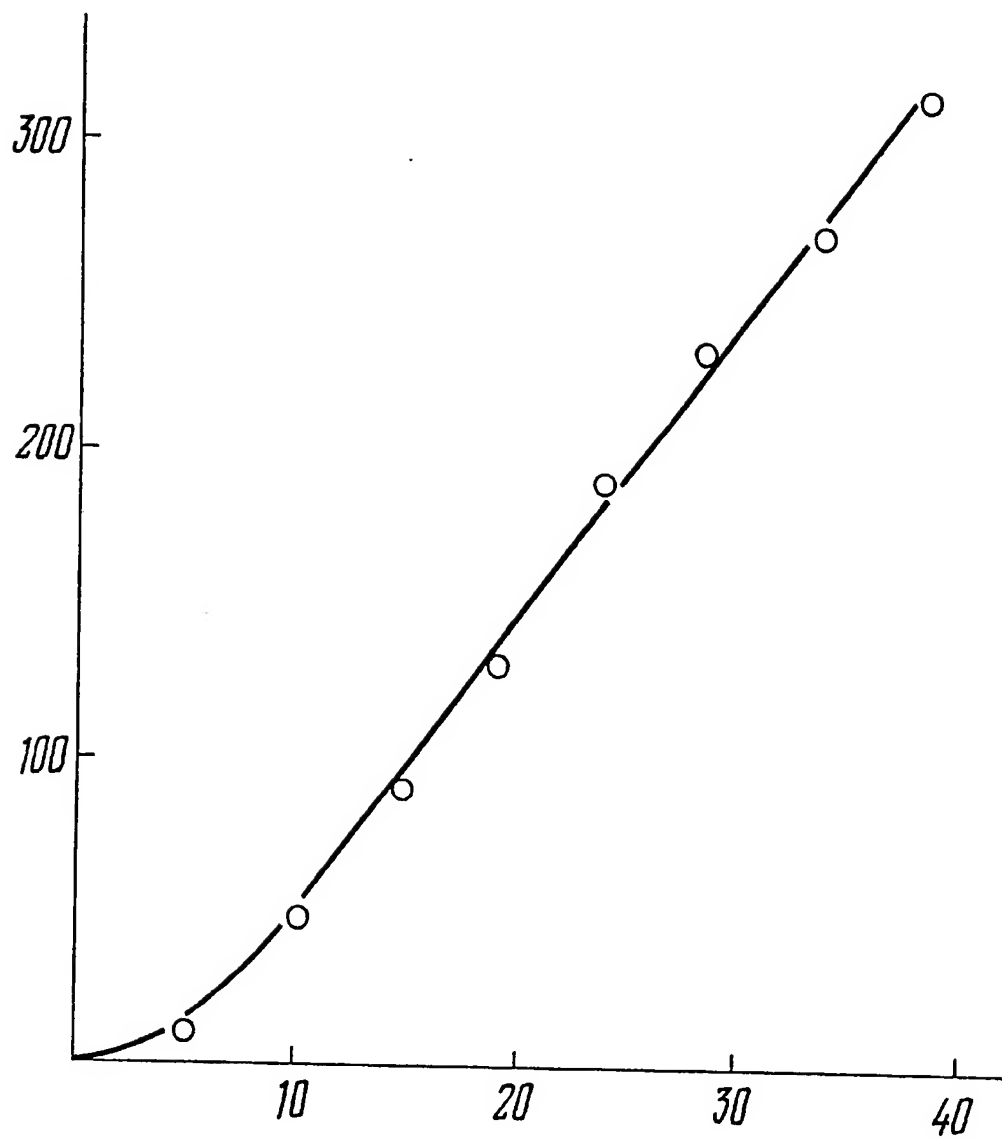
$2/5$ 

FIG.2

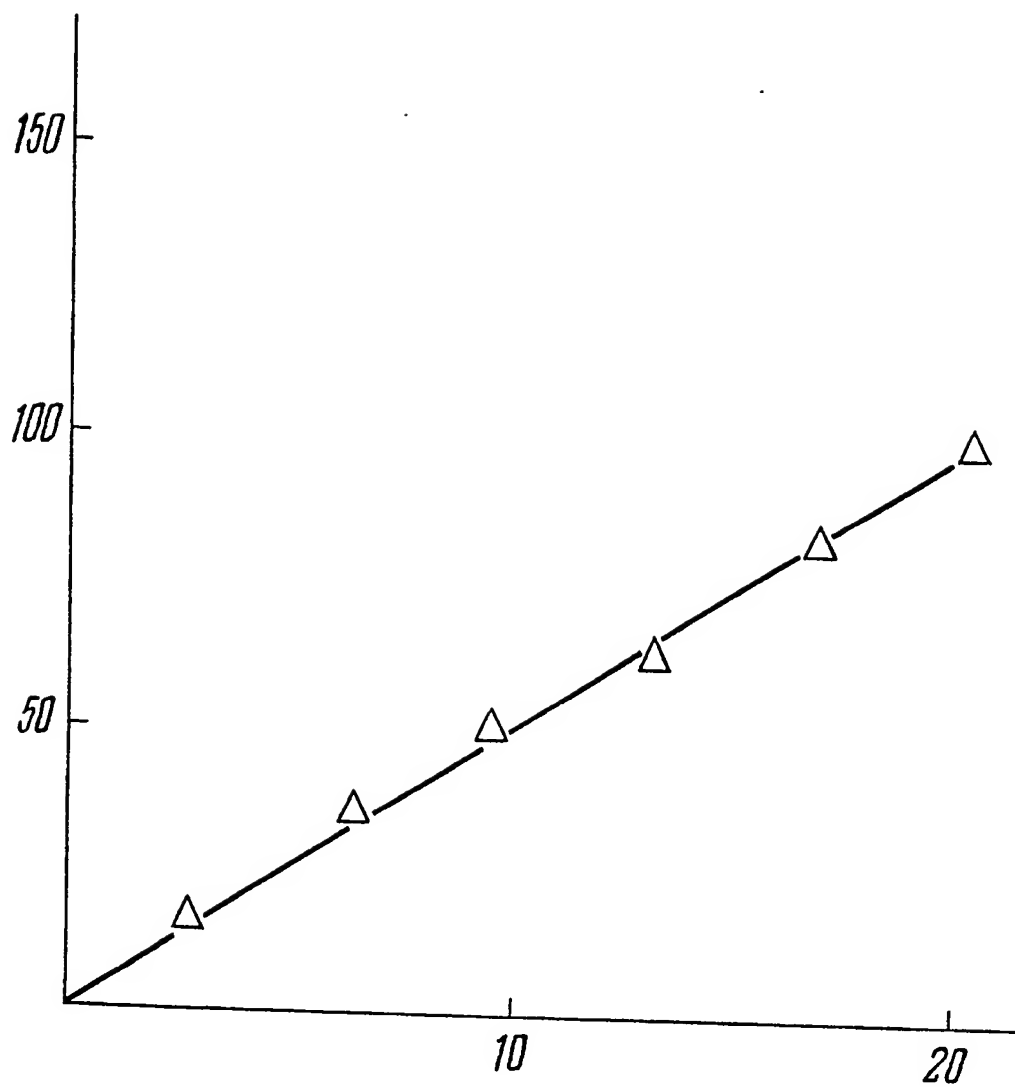
$3/5$ 

FIG. 3

4/5

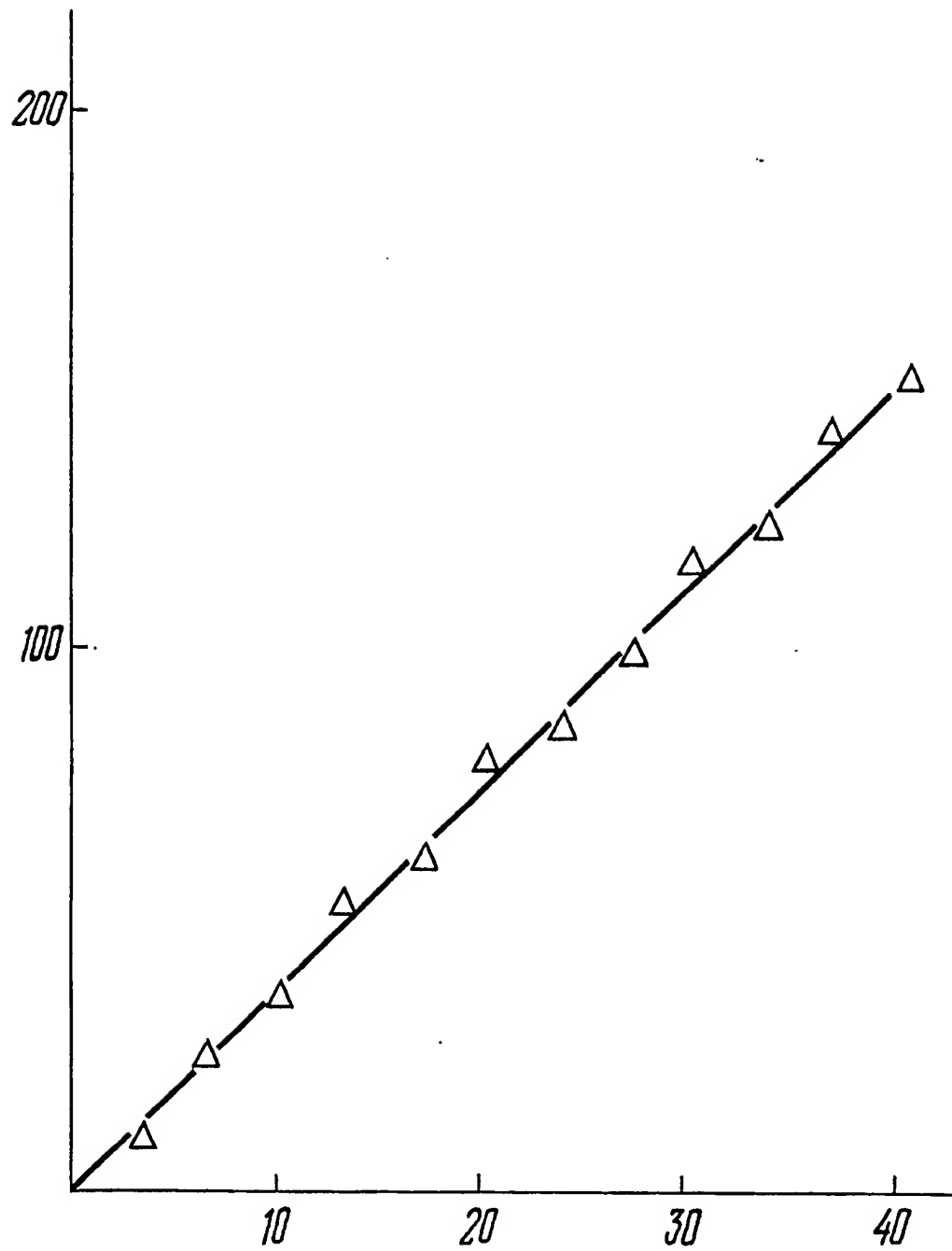


FIG. 4

5/5



FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT 00312617

International Application No PCT/SU 88/00078

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
IPC C12P 21/00, C12N 15/00		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System	Classification Symbols	
IPC 4	C07K 13/00, C12P 21/00, C12N 15/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 82, Nr. 15, August 1985 (WASHINGTON) K. E. Rogers et al. "Olfactory neuron-specific protein is translated from a large poly (A) ⁺ mRNA, see pages 5218-5222	1
A	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 82, Nr. 6, March 1985 (WASHINGTON) M. CLELIA GANOZA et al. "Isolation and point of action of a factor from Escherichia coli required to reconstruct translation", see pages 1648-1652	1
A	EP, A1, 0152483 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 28 August 1985 (28.08.85) see the abstract	1
./.		
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the International filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
17 June 1988 (17.06.88)	8 August 1988 (08.08.88)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
ISA/SU		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	European Journal of Biochemistry, vol. 93, Nr. 1, January 1979, (Published by Springer -Verlag Berlin Heidelberg New York), Warwick BOTTOMLEY et al. "Cell-Free Transcription and Translation of Total Spinach Chloroplast DNA" see pages 31-39	1
A,E	BIOPOLIMERY I KLETKA, vol. 4, Nr. 3, May-June 1988, (Naukova dumka, Kiev), A.P. Potapov et al. " Sravnitelnoe izuchenie matrichnoi aktivnosti polya (U) i polya (dT) v beskлетochnykh beloksintezi-ruyuschikh sistemakh iz ESCHERICHIA COLI i zarodyshei pshenitsy" see pages 133-138	1